

# AA

**SEIBEL et al.**

**U.S. Serial No.: 08/765,244**

**Filing Date : February 23, 1998**

**Attorney Docket No.: 8484-018-999**

**PEMP-99821.1**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-99976

(43)公開日 平成7年(1995)4月18日

(51)Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09				
C 07 H 21/00				
21/04	Z			
C 07 K 7/06	Z NA	8318-4H 9050-4B	C 12 N 15/00 審査請求 未請求 請求項の数11	A OL (全10頁)
(21)出願番号	特願平5-244753		(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成5年(1993)9月30日		(72)発明者	岩佐 進 京都府綴喜郡田辺町大住ヶ丘1丁目21番地 の2
			(72)発明者	多田 宏子 兵庫県川西市湯山台1丁目30番4号
			(72)発明者	道券 一浩 大阪府大阪市住吉区苅田5丁目16番6- 604号
			(74)代理人	弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54)【発明の名称】 修飾オリゴヌクレオチド

(57)【要約】

【目的】アンチセンスDNAあるいはRNAを効率よく細胞内の作用部位に移行可能な核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドを提供する。

【構成】核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとを結合させてなる修飾オリゴヌクレオチド。

【効果】標的組織に運搬されたのち効率良く細胞内に取り込まれ、さらに核内へ移行し、低用量でアンチセンス治療効果を挙げることができる。

1

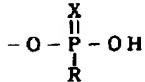
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとを結合させてなる修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項2】核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとをリンカーを介して結合させてなる請求項1記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項3】核局在シグナルペプチドの官能基と、オリゴヌクレオチドの3'ーもしくは5'ー末端の水酸基または

【化1】



(式中、XはOまたはSを、RはOHまたはCH<sub>3</sub>を示す)で表される基とをリンカーを介して結合させてなる請求項2記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項4】官能基がアミノ基、カルボキシル基またはスルヒドリル基である請求項3記載の修飾オリゴヌクレオチド。

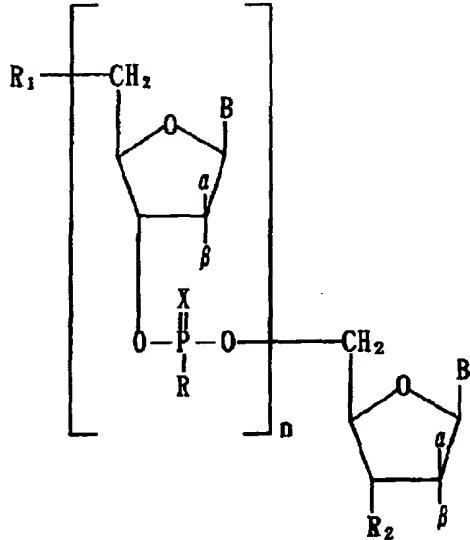
【請求項5】オリゴヌクレオチドの3'ーもしくは5'ー末端が水酸基である請求項3記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項6】核局在シグナルペプチドがPro-(Lys)<sub>3</sub>-Arg-Lys-Valを含むペプチドである請求項1記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項7】核局在シグナルペプチドがそのC末端にシステイン残基を含むペプチドである請求項1記載の修飾オリゴヌクレオチド。

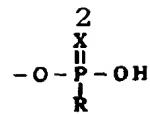
【請求項8】オリゴヌクレオチドが式:

【化2】



(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は同一または異なって水酸基あるいは

【化3】



(式中、XはOまたはSを、RはOHまたはCH<sub>3</sub>を示す)を、XおよびRは前記と同意義を、Bはビリミジンまたはアリン核酸塩基を、nは7以上の整数を示す。αおよびβはいずれか一方が水素であり他方は水素、水酸基またはフッ素である)である請求項1記載の修飾オリゴヌクレオチド。

10 【請求項9】R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>のうち少なくとも一方が水酸基である請求項8記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項10】XがSかつRがOHである請求項8記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項11】nが15~20である請求項8記載の修飾オリゴヌクレオチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アンチセンスDNAあるいはRNAを効率よく細胞内の作用部位に移行可能な核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドに関する。

## 【0002】

【従来の技術】特定の相補的塩基配列を用いて、遺伝子の転写・スプライシング・核膜透過または翻訳をDNAレベルあるいはmRNAレベルで阻害するアンチセンス技術が近年急速に進展してきた。本技術は、従来の医薬品と全く異なる作用様式で特定の機能蛋白の発現を特異的に抑制できるため、特に医薬品の開発研究に応用されている[S.T.Crooke:Bio/Technol., 10, 882(1992)]。通常アンチセンスとしては翻訳開始領域などを含む15~25mer程度のオリゴヌクレオチドが用いられるが、これらのオリゴDNAあるいはRNAは細胞内に取り込まれたのち特定の蛋白をコードするDNAあるいはmRNAと、DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNAの形のハイブリッドを形成し、上記に示した遺伝子の転写・スプライシング・核膜透過または翻訳を阻害する。またハイブリッド形成によりRNase HによるmRNAの特異的な分解を促進することも知られている[川上純司ら:PHARM TECH JAPAN, 8, 395(1992)]。アンチセンス技術が生物学的特異性の高い医薬品として潜在的な可能性を有することは、癌遺伝子産物・増殖因子・各種

30 ウィルスなどを標的とする数多くの invitro実験での証明で明らかであるが、その可能性にもかかわらず一方で医薬品としての実用化に多くの疑問が持たれていた。その原因として、1) in vivoに投与されたオリゴヌクレオチドが生体内で不安定であること、例えば血中や細胞内のヌクレアーゼにより容易に分解されること、2) 組織移行性・細胞内取り込み・細胞内移行性(核への移行性)に問題があり、標的部位への到達が困難であること、3) オリゴヌクレオチドの製造上の問題、すなわちその純度および製造コストに問題があること、またこれらの結果として、4) 標的蛋白の発現抑制が必ずしも十

40 ものの、本発明によれば、上述の問題を解決することができる。本発明によれば、核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドが生体内で不安定であることを除く、他の問題は解決される。すなわち、本発明によれば、オリゴヌクレオチドが生体内で不安定であること、例えば血中や細胞内のヌクレアーゼにより容易に分解されること、2) 組織移行性・細胞内取り込み・細胞内移行性(核への移行性)に問題があり、標的部位への到達が困難であること、3) オリゴヌクレオチドの製造上の問題、すなわちその純度および製造コストに問題があること、またこれらの結果として、4) 標的蛋白の発現抑制が必ずしも十

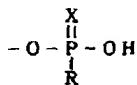
【発明が解決しようとする課題】本発明は、アンチセンスDNAあるいはRNAを効率よく細胞内の作用部位、特に核内へ移行させ、標的となる遺伝子と反応して、その目的である遺伝子の転写・スプライシング・核膜透過または翻訳の阻害を達成するために、より有利に使用できる核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドを提供する。

## 【0007】

【課題を提供するための手段】本発明者らは、現状のアンチセンスオリゴヌクレオチドあるいはその誘導体が必ずしも十分な細胞膜透過性あるいは細胞内移行性を有していない現状を鑑み、それを効率よく細胞内の作用部位、すなわち標的蛋白をコードするDNAあるいはmRNAと反応させる手段について鋭意研究を重ね、アンチセンスオリゴヌクレオチドを核局在シグナルで修飾することにより、細胞内移入および核内移行を改善してアンチセンス効果を増強させることを見いだし、さらに研究し本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、(1)核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとを結合させてなる修飾オリゴヌクレオチド、(2)核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとをリンカーを介して結合させてなる上記(1)記載の修飾オリゴヌクレオチド、および(3)核局在シグナルペプチドの官能基と、オリゴヌクレオチドの3'-もしくは5'-末端の水酸基あるいは式(I)

## 【化4】



(式中、XはOまたはSを、RはOHまたはCH<sub>3</sub>を示す)で表される基とをリンカーを介して結合させてなる上記(2)記載の修飾オリゴヌクレオチドに関するものである。

【0009】本発明における核局在シグナルペプチドとしては、核への局在化に関与するペプチド配列を含むものであればいずれのものでもよい。すでに40種以上の配列が同定されており[J.G.-Bustosら:Biochim.Biophys.Acta,1071,83(1991)]、例えば次のようなものが挙げられる。

1) 酵母の核蛋白MAT $\alpha$ 2やヒストン2Bのそれぞれ Lys-Ile-Pro-Ile-Lys [M.N.Hallら:Cell,36,1057(1984)] や Gly-(Lys)<sub>2</sub>-Arg-Ser-Lys-Ala [R.B.Morelandら:Mol.Cell.Biol.,7,4048(1987)] 、

2) SV40やポリオーマウイルスlarge T-抗原のそれぞれ Pro-(Lys)<sub>3</sub>-Arg-Lys-Val [D.Kalderonら:Nature,311,33(1984)] や Val-Ser-Arg-Lys-Arg-Pro-Arg-Pro-Ala [W.D.Richardsonら:Cell,44,77(1986)] 、

3) アデノウイルスE1a、pTPおよびDBPのそれぞれ Lys-Arg-Pro-Arg-Pro [R.H.Lyonsら:Mol.Cell.Biol.,7,2451(1987)] 、Arg-Leu-Pro-Val-(Arg)6-Val-Pro [L-J.Zhao 50

& R.Padmanabhan:Cell,55,1005(1988)] および (Pro)<sub>2</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Arg [N.Morinら:Mol.Cell.Biol.,9,4372(1989)] 、

4) アフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンの Arg-Pro-(Ala)<sub>2</sub>-Thr-(Lys)<sub>2</sub>-Ala-Gly-Gln-Ala-(Lys)<sub>4</sub>-Leu-Asp [C.Dingwallら:Cell,30,449(1982)] 、

5) ヒト癌遺伝子c-myb、N-mycおよびp53のそれぞれ Pro-(Leu)<sub>2</sub>-(Lys)<sub>2</sub>-Ile-Lys-Gln、(Pro)<sub>2</sub>-Gln-(Lys)<sub>2</sub>-Ile-Lys-Ser および Pro-Gln-Pro-(Lys)<sub>3</sub>-Pro [C.V.Dang & W.M.F.Lee:J.Biol.Chem.,254,18019(1989)] 、

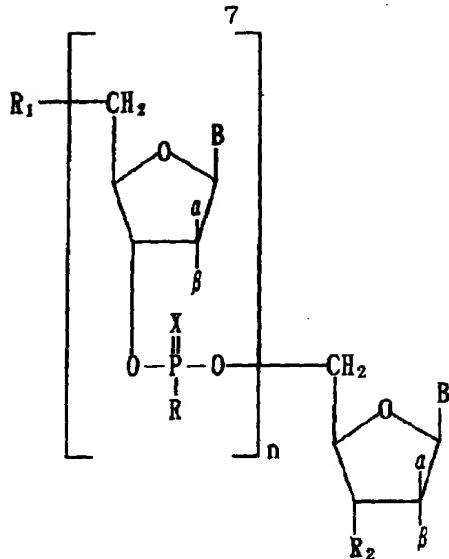
6) ヒト熱ショック蛋白(Hsp70)の Phe-Lys-Arg-Lys-His-(Lys)<sub>2</sub>-Asp-Ile-Ser-Gln-Asn-Lys-Arg-Ala-Val-(Arg)<sub>2</sub> [C.V.Dang & W.M.F.Lee:J.Biol.Chem.,254,18019(1989)] 。

【0010】該核局在シグナルペプチドとしては、DNA型発癌ウイルスの一種であるSV40由来の核蛋白large T-抗原は、細胞質内リボソーム上で合成後きわめて効率良く核内に運搬されることから、そのlarge T-抗原に含まれるペプチド配列 Pro-(Lys)<sub>3</sub>-Arg-Lys-Val を含むものは、強力なシグナルとして好ましく用いられる。さらによくまた、最近人工核局在シグナルペプチドの設計も進み、これらが天然由来の配列と同様に機能することが分かりつつあり、これらも本発明の核局在シグナルペプチドとして使用しうる。すなわち、上記のように天然から同定された核局在シグナルペプチドは、ほぼ塩基性アミノ酸クラスターとブロリンクラスターとからなるという特徴を有しており、この情報を基に人工核局在シグナルペプチドが合成されている。例えば、(Pro)<sub>4</sub>-Lys-Ile-(Lys)<sub>4</sub> が挙げられるが、これは天然の配列と同様に機能することが分かっている[田中真人:日本薬学会第113年会予稿集I-p.130(1993)]。

【0011】本発明における核局在シグナルペプチドとしては、その機能を失わない限り、核局在シグナルペプチド配列以外のペプチド配列をその前後に含んでいてよい。例えば、本発明の修飾オリゴヌクレオチドの製造法において、核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとを結合させるにあたって、あらかじめ核局在シグナルペプチドのC末端あるいはN末端にシステイン残基を導入しておき、そのスルフヒドリル基を官能基として利用することができる。本発明におけるオリゴヌクレオチドとしては、アンチセンスとして用いられるDNAまたはRNA、およびその誘導体であればその配列には何ら制限はなく、特定の遺伝子配列を阻害する目的で細胞内に輸送すべき核酸あるいはその誘導体を包含し、さらにはリボザイム[大川淳ら:Pharm.Tech.Japan,8,491(1992)、N.Sarver:Science,247,1222(1990)]をも包含する。

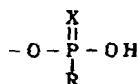
【0012】本発明におけるオリゴヌクレオチドとしては、式(I)

## 【化5】



(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は同一または異なって水酸基あるいは式(I))

【化6】



(式中、XはOまたはSを、RはOHまたはCH<sub>3</sub>を示す)を、XおよびRは前記と同意義を、Bはピリミジンまたはプリン核酸塩基を、nは7以上の整数を示す。αおよびβはいずれか一方が水素であり他方は水素、水酸基またはフッ素である)であるものが挙げられる。該オリゴヌクレオチドとしては、S-オリゴ(X=SでかつR=OH)やMP-オリゴ(X=OでかつR=CH<sub>3</sub>)が好ましく、特にS-オリゴは水溶性およびヌクレアーゼ抵抗性に優れ、また標的遺伝子とのハイブリッド形成能も高いことからより好ましい。R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>としては、すくなくとも一方が水酸基であるものが好ましい。Bで表されるピリミジン核酸塩基としては、例えシトシン、ウラシル、チミン、5-メチルシトシン、オキシメチルシトシンなどが挙げられる。さらにこれらの誘導体であってもよい。Bで表されるプリン核酸塩基としては、例えアデニン、グアニンなどが挙げられる。さらにこれらの誘導体であってもよい。

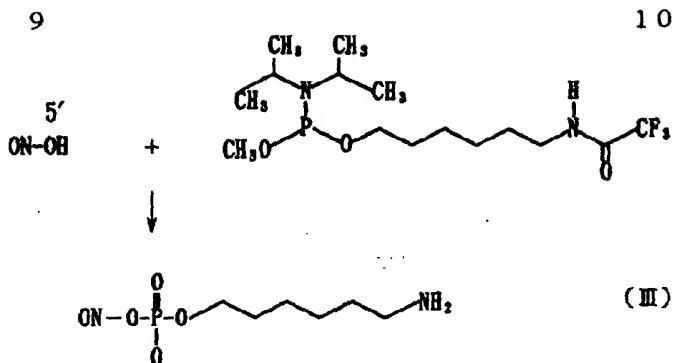
【0013】オリゴヌクレオチドに含まれるリボース部分の2'位については、デオキシ体の(α, β)=(H, H)であるもの、およびα, βのいずれか一方がフッ素あるいは水酸基で置換された(α, β)=(H, F),

(F, H), (H, OH), (OH, H)であるものが挙げられるが、なかでも(α, β)=(H, OH)であるものが好ましい。本発明の修飾オリゴヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの数としては7以上であるが、好ましくは10~25であり、さらに好ましくは15~20である。本発明において、標的となる遺伝子は、各種疾患においてその病因となっている特定の蛋白をコードする、あるいはその合成に関与する遺伝子配列が挙げられるが、そのような例として、ウイルス抗原(ヘルペス、インフルエンザ、エイズ、B型肝炎、C型肝炎、パピローマなど)、真菌類(菌壁蛋白、リボソーム蛋白など)、癌遺伝子(c-myc, N-myc, N-rasなど)、増殖因子(bFGF, IL-1, IL-2, TGF-βなど)、接着蛋白(ICAM-1, LFA-1, VCAM-1, セレクチンなど)および酵素(ホスホリバーゼA2、蛋白リン酸化酵素、糖転移酵素など)などが挙げられる。従って、対象疾患としてウイルス性疾患、各種細菌(真菌)感染症、癌、炎症、アレルギー、循環系疾患などが挙げられるが、特に従来の医薬品では十分な治療効果を得ていないウイルス性疾患や癌・免疫性疾患への適用が考えられる。一例として、免疫応答・癌の転移・リンパ球の浸潤などに深く関与する接着蛋白ICAM-1は標的蛋白として好適で、従ってこのICAM-1に対するアンチセンスは癌あるいはリウマチなどの治療薬として有望である。

【0014】本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、これらの疾病患者に投与されるとオリゴメクレオチドに結合した核局在シグナルペプチドが機能し、効率良く標的細胞に取り込まれ、また細胞内移入後も核内への移行が容易となって、アンチセンス効果の増強が図れるものである。本発明の修飾オリゴヌクレオチドにおいて、核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレオチドとを結合させる方法としては、両者をその機能を失わせることなく安定的に結合させうるものであれば、いかなる方法を用いてもよい。一例として、核局在シグナルペプチドの官能基(例えアミノ基、カルボキシル基、スルフィドリル基)とオリゴヌクレオチドの3'-もしくは5'-末端の水酸基または式(I)で表される基とをリンカーを介して結合させる方法について次に説明する。

【0015】(1)まず、オリゴヌクレオチドの3'-もしくは5'-末端の水酸基または式(I)で表される基に、あらかじめアミノ基またはスルフィドリル基を導入する。例え、下記式の反応のように

【化7】



〔式中、ONはオリゴヌクレオチドを示す〕、市販のAMINOLINK-2（アプライドバイオシステムズ社製）あるいは5'-Amino-Modifiers（グレンリサーチ社製）を用いてオリゴヌクレオチドの5'末端にアミノ基を導入すればよい〔B.A.Connolly & P.Rider:Nucleic Acids Res., 13, 4485(1985)、B.S.Sproatら:Nucleic Acids Res., 15, 4837(1987)〕。また、同様に市販の5'-Thiol-Modifiers（グレンリサーチ社製）を用いてオリゴヌクレオチドの5'末端にスルフヒドリル基を導入することもできる〔B.A.Connolly & P.Rider:Nucleic Acids Res., 13, 4485(1985)、B.S.Sproatら:Nucleic Acids Res., 15, 4837(1987)〕。一方、オリゴヌクレオチドの3'末端においても、アミノ基あるいはスルフヒドリル基を導入することもできる。例えば、市販の3'-amine-ON CPG担体（クロンテック社製）を用いて3'末端に(3'-アミノ-2-ヒドロキシプロピル)フォスフェート基[(3-amino-2-hydroxyl-propyl)phosphate]を導入する〔B.Oberhauser & E.Wagner:Nucleic Acids Res., 20, 533(1992)〕。次いで、該3'-アミノオリゴヌクレオチド誘導体にN-succinimidyl-3-(2-pyridylidithio)propionate (SPDP；ファルマシア社製)を反応させた後、ジチオスレートールで還元することにより3'末端にスルフヒドリル基を導入できる。

【0016】(2) 次いで、オリゴヌクレオチドに導入されたアミノ基またはスルフヒドリル基を用いて、核局在シグナルペプチドとを結合させることによって、本発明の修飾オリゴヌクレオチドを製造することができる。オリゴヌクレオチド末端に導入されたアミノ基あるいはスルフヒドリル基と核局在シグナルペプチドとの結合にあたっては、種々の方法が使用できる[A.H. Blair & T. I. Ghose: J. Immunol. Methods, 59, 129(1983)、北川常廣:有機合成化学, 42, 283(1984)]。例えば、核局在シグナルペプチドがシステイン残基を含む場合、(i) オリゴヌクレオチド末端のアミノ基をSPDPと反応させ、オリゴヌクレオチドにジチオビリジル基を導入し、さらに核移行シグナルのシステイン残基とのS-S交換反応により目的の核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドを合成する、(ii) オリゴヌクレオチド末端のアミノ基をマレイミド基含有活性エステル(二官能性結合試薬)、例えば

\* N-( $\gamma$ -maleimidobutyryloxy)succinimide (同仁化学製) やあるいはN-( $\epsilon$ -maleimidocaproyloxy)succinimide (EMCS; 同仁化学製) と反応させマレイミド基を導入後、核局在シグナルを添加しチオエーテル結合により目的的の核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドを合成する、などの方法が挙げられる。

【0017】またオリゴヌクレオチドがシステイン残基を含む場合、上記(i)および(ii)の反応を逆にして、核

20 局在シグナルに含まれるアミノ基、例えば、リジンのε-アミノ基あるいはN末端の $\alpha$ -アミノ基を二官能性結合試薬で修飾しマレイミド化後、オリゴヌクレオチドを反応させチオエーテル結合により目的の核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドを合成することもできる。さらには、あるいは両者がスルフヒドリル基を含む場合は、S-S結合反応により直接に目的の核局在シグナル修飾オリゴヌクレオチドを合成できる。この他、オリゴヌクレオチドと核局在シグナルの両者のアミノ基およびスルフヒドリル基を利用する方法、例えば、同反応二価性試薬

30 (①アミノ基を利用する例、disuccinimidyl tartarate : J.Biol.Chem. 261, 205 (1986), グルタルアルデヒド : Immunochem. 6, 43 (1969) )、②スルフヒドリル基を利用する例、N,N'-1,4-phenylenedimaleimide : Biochem. 16, 3334 (1977), disuccinimidyl suberate : J.Biol.Chem. 256, 5306 (1981) ) を用いて本発明の修飾オリゴヌクレオチドを製造することもできる。あるいはオリゴヌクレオチドのアミノ基と核局在シグナルのカルボキシル基とを利用する方法、例えば、カルボジイミド法 (Antimicrb.Aagents Chemother. 7, 42 (1975)) や N-40 ヒドロキシスクシミド法 (北川常広 : 有機合成協会誌 42, 283 (1984)) を用いて、本発明の修飾オリゴヌクレオチドを製造することもできる。

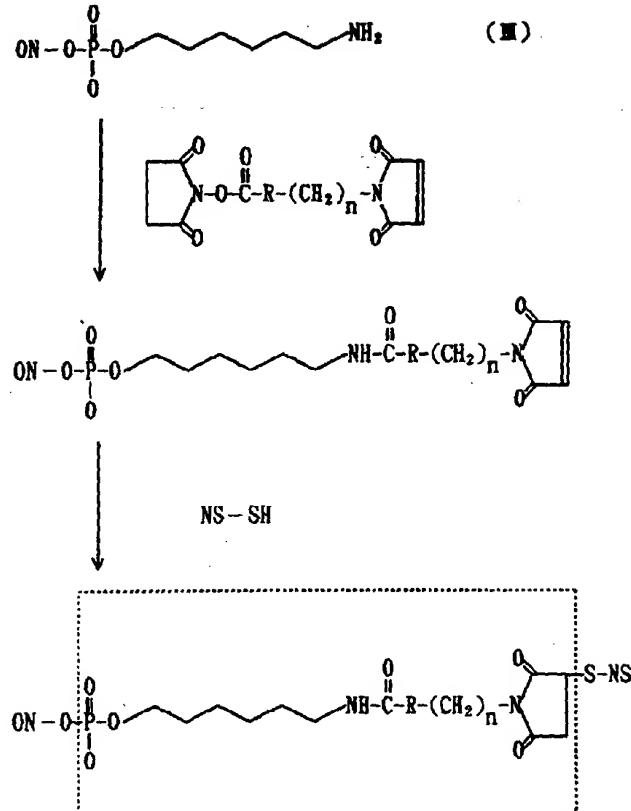
【0018】上記した方法の中でも、本発明の修飾オリゴヌクレオチドを製造するにあたっては、核局在シグナルペプチドのC末端あるいはN末端にシステイン残基をあらかじめ導入した核局在シグナルペプチド誘導体を利用することが好ましい。例えば、C末端にシステイン残基を導入した核局在シグナルペプチド誘導体を、予め二官能性結合試薬でマレイミド化したオリゴヌクレオチドと反応させる方法が挙げられ、本発明の修飾オリゴヌク

11

レオチドを収率良く得る手段として好ましい(下記方法  
\*(A)参照)。

12

\*【化8】



〔式中、NSはシステイン残基をあらかじめ導入した核  
局在シグナルペプチド誘導体を、nは1～6の整数を、  
Rは結合手または2価の6員環状炭化水素残基を、ON  
は前記と同意義を示す〕。方法(A)におけるRで表さ  
れる2価の6員環状炭化水素残基としては、飽和のも  
の、不飽和のもののいずれでもよい。飽和のものとし  
ては、例えば、1, 2-、1, 3-、1, 4-シクロヘキ  
シレンが挙げられ、不飽和のものとしては、例えば、  
1, 2-、1, 3-、1, 4-フェニレンなどが挙げら  
れる。

【0019】本発明の修飾オリゴヌクレオチドにおける  
リンカーとは、核局在シグナルペプチドとオリゴヌクレ  
オチドとを結合させるための架橋部分を形成するもので  
あって、例えば、核局在シグナルペプチドの官能基(例  
えば、アミノ基、カルボキシル基、スルヒドリル基)  
とオリゴヌクレオチドの3'-もしくは5'-末端の水酸  
基または式(I)で表される基とを結合させるための架  
橋部分を形成するものである。上記方法(A)では点線内  
で囲まれたものをリンカーと称する。本発明の核局在シ  
グナルで修飾されたオリゴヌクレオチドは、通常自体公  
知の担体・希釈剤などを用い適宜の医薬品組成物として  
経口的または非経口的に哺乳動物(例、サル・イヌ・ブ  
タ・ウサギ・マウス・ラット・ヒトなど)に投与でき

※る。経口投与のための組成物としては、固体または液体  
の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティン  
グ錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフ  
トカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤など  
が挙げられる。かかる組成物は自体公知の方法によつて  
製造でき、製剤分野において通常用いられる担体もしく  
は賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体  
もしくは賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステ  
アリン酸マグネシウムなどが挙げられる。非経口投与の  
ための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが挙  
げられ、注射剤は皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤  
などの剤形を包含する。かかる注射剤はそれ自体公知の  
方法、すなわち本発明の修飾オリゴヌクレオチドを通常  
注射剤用に用いられる無菌の水性もしくは油性液に懸濁ま  
たは乳化することによって調製される。注射用の水性液  
としては生理食塩水、等張液などが挙げられ、必要によ  
り適当な懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロー  
ス、非イオン性界面活性剤などと併用してもよい。油性  
液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤  
としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを  
併用してもよい。調製された注射液は通常適当なアンプ  
ルに充填される。また、本発明の修飾オリゴヌクレオチ  
ドをリポソームに包埋したり、あるいはカチオン性の脂

13

質と混合し投与することもでき、この場合、より一層の細胞内移入が期待できる。

【0020】本発明の修飾オリゴヌクレオチドは、標的組織に運搬されたのち効率良く細胞内に取り込まれ、さらに核内へ移行し、低用量でアンチセンス治療効果を挙げることができる。このため、副作用が少なく、より安全に使用できる。例えば、抗ウイルス・抗菌・抗腫瘍あるいは抗炎症のための医薬として用いられ、その場合成人1日当り10mg～2gを静注、筋注または皮下注などにより投与される。また経皮剤としても使用できる。また、本発明の修飾オリゴヌクレオチドはアンチセンスDNAあるいはRNAを効率よく細胞内に移行させることができるので、本発明の修飾オリゴヌクレオチドを細胞に注入し、相補的な遺伝子の発現を抑止して、未知の遺伝子の機能を推定することにも使用できる。

【0021】

【実施例】以下に参考例、実施例および実験例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1．オリゴヌクレオチド・ホスホロチオエート体(S-オリゴ)の合成

DNA合成機(アプライドバイオシステムズ社製モデル392)においてホスホロチオエート型用プログラムを用いて、下記式(α)および(β)で表される2種のS-オリゴを合成した。それぞれICAM-1の転写開始領域に対するアンチセンス配列およびそれに対するリバース配列を有する(式中、A, G, C, Tはそれぞれアデノシン、グアニン、シトシン、チミンを表す。)。

(α) 5'-TGGGAGCCATAGCGAGGC-3' (配列番号: 1)

(β) 5'-CGGAGCGATAACGAGGGT-3' (配列番号: 2)

すなわち、1μmoleスケールの固相カラムとDNA合成用試薬(いずれもアプライドバイオシステムズ社製)とを用いてホスホロアミダイト法により合成し、以下常法に従いカラムより切り出し脱保護した[A.Chollet & E.H.Kawashima:Nucleic Acids Res., 13, 1529(1985)]。得られたS-オリゴを逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。収量(α):1.67mg, (β):1.25mg。得られた精製S-オリゴ体(約1μg)をホルムアミド存在下95°Cで2分間処理し変性後、50%尿素を含むポリアクリラミドゲルに供した。電気泳動終了後、エチジウムプロマイド染色した。結果を〔図1〕に示した。(α)および(β)、いずれのS-オリゴ体も1本のバンドを示した。また同様に、次のA, B 2種の溶出浴液を用いる逆相高速液体クロマトグラフィー(μBONDASPHERE 5μ C18-300A: ウオタース社製)に供した。流速: 1.0 ml/min。溶出条件: 0～5分90%A/10%B、5～25分90%A/10%Bから40%A/60%Bへの濃度勾配溶出。得られた結果を〔図2〕に示した。

A: 5%アセトニトリル含有0.1Mトリエチル酢酸アンモニウム緩衝液(pH7.0)

14

B: 40%アセトニトリル含有0.1Mトリエチル酢酸アンモニウム緩衝液(pH7.0)

(α)および(β)、それぞれのS-オリゴ体は15.09分および15.50分に主要ピークを示した。

【0022】実施例1. ICAM-1アンチセンスS-オリゴの修飾

(1) S-オリゴのアミノ化

参考例1で得られた1μmoleスケールの固相カラムに結合したS-オリゴ(α)誘導体に市販のAMINOLINK-2(アプライドバイオシステムズ社製)を添加し、公知の方法に従い<sup>14</sup>末端にアミノ基を導入した[B.A.Connolly & P.Rider:Nucleic Acids Res., 13, 4485(1985)]。固相カラムからは28%アンモニア水を用いて切り出し、さらに55°Cで8時間インキュベートして脱保護した。スピードバックコンセントレーターを用いて乾固したのち、蒸留水に再溶解しPD-10ゲル沪過カラムで低分子物質を除去した。収量2.1mg。

(2) アミノ化S-オリゴのマレイミド化

(1)で取得したアミノ化S-オリゴ1.2mgを50mMリン酸緩衝液(pH7.5)1.2mlに溶解したのち、マレイミド化試薬EMCS 6mg/60μlジメチルホルムアミド溶液を徐々に添加した。室温で4時間反応後、PD-10ゲル沪過カラムで精製した。収量840μg。

(3) 核局在シグナルペプチドによる修飾

(2)で取得したマレイミド化S-オリゴ140μg/200μl 50mMリン酸緩衝液(pH6.5)に核局在シグナルペプチドPro-(Lys)<sub>3</sub>-Arg-Lys-Val-Cys 100μg/10μl蒸留水を添加し室温で5時間反応させた。ゲル沪過カラムにより精製後、スピードバックコンセントレーターを用いて濃縮した。収量40μg。

【0023】実験例1. ICAM-1発現抑制活性(1)

参考例1で作製したアンチセンスS-オリゴ(α)、リバースS-オリゴ(β)あるいは実施例1で作製した核局在シグナルペプチド修飾アンチセンスS-オリゴとリポフェクチン(10μg/ml)とを含む無血清培地(ダルベッコMEM培地(D-MEM); コスモ社販売)を、ヒト肺癌細胞株A549に添加した。4時間細胞培養後、IL-1β(40pg/ml)を含む10%非動化(56°C, 30分)ウシ胎児血清添加D-MEM培地に置換し、さらに4時間培養した。次いでA549細胞を0.

40 1%グルタルアルデヒドで固定後、財団法人発酵研究所(IFO)に IFO 50391として寄託されているマウス抗ヒトICAM-1モノクローナル抗体SM-1(特願平5-37262号)を用いる酵素免疫測定法(EIA)により細胞表面に発現されたICAM-1量を測定した。すなわちA549細胞に結合したマウス抗体量を西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(コスモ社販売)を用いて測定し、ICAM-1発現量を比較した。得られた結果を〔表1〕に示した。リバースS-オリゴは全く発現抑制能を示さないが、アンチセンスS-オリゴは0.33μM濃度で有意な発現抑制を示した。一方、核局在シグナルペプチド修飾ア

15

ンチセンスS-オリゴは0.11μM濃度で既に有意な発現抑制を示し、さらに0.33μM濃度ではほぼ80%の強い発現抑制活性を示した。

16

\*【0024】  
【表1】

\*

S-オリゴ	% ICAM-1 発現抑制活性		
	0.04μM	0.11μM	0.33μM
リバース	< 5	< 5	< 5
アンチセンス	< 5	13	43
核局在シグナルペプチドアンチセンス	9	21	76

## 【0025】実験例2. ICAM-1発現抑制活性(2)

実験例1と同様の手順でICAM-1発現試験を実施した。被検S-オリゴ(1.0μM)3種はいずれも、3μg/mlあるいは10μg/mlのリポフェクチンに懸濁し懸的細胞A549に添加した。A549細胞に発現されたICAM-1量は実験例1と同様の方法によりEIAで測定した。得られた結果は【表2】に示した通りであった。3μg/mlおよび10μg/ml、※

※いずれのリポフェクチン濃度においても核局在シグナルペプチド修飾アンチセンスS-オリゴは未修飾アンチセンスS-オリゴよりも有意に強いICAM-1発現抑制能を示した。

## 【0026】

## 【表2】

S-オリゴ (1.0μM)	% ICAM-1 発現抑制活性	
	リポフェクチン濃度 3 μg/ml	10 μg/ml
リバース	< 5	< 5
アンチセンス	11	45
核局在シグナルペプチドアンチセンス	18	65

## 【0027】

## 【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 18

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 1本鎖 (single)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (アンチセンス)

配列:

TGGGAGCCAT AGCGAGGC 18

## 【0028】配列番号 (SEQ ID NO) : 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 18

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 1本鎖 (single)

★トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : 他の核酸 (アンチセンス)

配列:

CGGAGCGATA CCGAGGGT 18

## 30 【図面の簡単な説明】

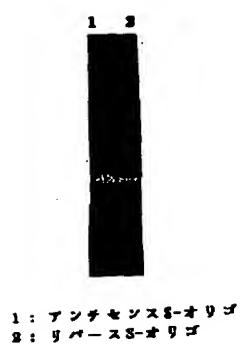
【図1】は、実験例1で作製したアンチセンスS-オリゴおよびリバースS-オリゴの電気泳動の結果を示す。図中、1はアンチセンスS-オリゴの、2はリバースS-オリゴの結果をそれぞれ示す。

【図2】は、実験例1で作製したアンチセンスS-オリゴのクロマトグラフィーの結果を示す。

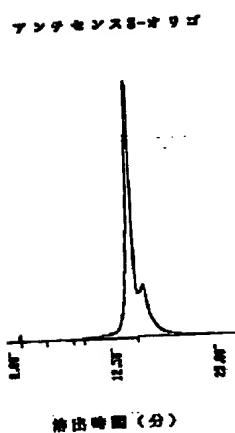
【図3】は、実験例1で作製したリバースS-オリゴのクロマトグラフィーの結果を示す。

★

【図1】



【図2】



【図3】

